Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.1, Spring 2021, P. 55-62
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۶۲-۵۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله پژوهشی

تأثیر غلظت‌های مختلف نیتروژن و 2,4-D بر تولید کالوس و گیاهچه زامیفولیا *Zamioculcas zamiifolia* Engl. در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

عاطفه قوچانی خراسانی[۱]- ایمان روح اللهی[۲*]- پوراندخت گلکار[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

چکیده

زامیفولیا با نام علمی *Zamioculcas zamiifolia* متعلق به خانواده Araceae است. به دلیل مشکلات تکثیر سنتی گیاه زامیفولیا، کشت بافت آن جهت تکثیر سریع و تولید گیاهان عاری از بیماری در زمانی کوتاه‌تر پیشنهاد می‌شود. در این پژوهش اثر تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی 2,4-D، غلظت‌های متفاوت نیتروژن کل و نسبت‌های نیترات به آمونیوم بر بهبود رشد گیاه زامیفولیا در آزمایش‌های جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول تولید کالوس از برگ کامل زامیفولیا در محیط کشت‌های ۱/۲MS تغییر یافته، MS تغییر یافته با دو غلظت تنظیم کننده رشد 2,4-D (۹/۰۵ و ۱۸/۱ میکرو مولار) مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم اثر دو غلظت نیتروژن کل ۴۸ و ۲۴ میکرو مولار و دو نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۳ و ۱:۱ در حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نفتالن استیک اسید (NAA) با غلظت ۲/۶۹ میکرومولار و بنزیل آمینو پورین (BAP) با غلظت ۲/۲۲ میکرومولار بر تولید گیاهچه کامل در کوتاه‌ترین دوره رشدی، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تاثیر بسترهای کاشت مختلف بر سازگاری گیاهچه‌های تولید شده کشت بافتی در محیط برون شیشه‌ای ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمایش اول نشان داد که حجیم‌ترین کالوس‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ تغییر یافته و تنظیم کننده رشد 2,4-D با غلظت ۹/۰۵ میکرومولار در مقایسه با سایر تیمارها تولید شد. مطابق نتایج این تحقیق در هفته‌های ابتدایی در تیمار نیتروژن کل ۲۴ میکرومولار و نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۳ بیشترین اندازه کالوس و تعداد برگ مشاهده شد. اما در هفته‌های بعدی تحت غلظت نیتروژن کل ۴۸ میکرومولار و نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۱ افزایش رشد رویشی در گیاهچه‌های تولید شده مشاهده شد. گیاهچه‌های کشت شده در بستر پیت ماس بیشترین تعداد جوانه برگ را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: زامیفولیا، کالوس، نسبت نیترات به آمونیوم

مقدمه

زامیفولیا با نام علمی *Zamioculcas zamiifolia* متعلق به خانواده Araceae و یک گیاه چند ساله است. این گیاه بومی شرق آفریقا، در جنگل‌های مرطوب گرمسیری و یا زمین‌های سنگی رشد می‌کند (۸). گیاهی زیبا با برگ‌های چرمی و براق که بسیار مناسب آپارتمان است چراکه گیاهی مقاوم بوده و برای منازلی که دسترسی کافی به نور ندارند ایده آل می‌باشد (۸). زامیفولیا یکی از گیاهان زینتی است که در شرایط درون‌شیشه‌ای با موفقیت تکثیر پیدا کرده است (۱۱). ریزازدیادی زامیفولیا به صورت درون‌شیشه‌ای مشکلات تکثیر سنتی این گیاه را برطرف کرده و امکان تولید این گیاه درمدت زمان کوتاهتر را فراهم آورده است در پژوهش‌های مشابه در بازه زمانی میانگین ۲۴ هفته به گیاهچه کشت بافتی دست یافتند (۱۱). اجزا تشکیل دهنده محیط کشت را می‌توان به صورت عناصر پرمصرف، ویتامین‌ها، اسید آمینه و دیگر مواد نیتروژن‌دار، قندها، مواد آلی، مواد جامد و مواد تنظیم کننده رشد گروه‌بندی کرد. یکی از اجزای مهم محیط کشت نیتروژن می‌باشد. نیتروژن، از اجزای مهم در ساختار مولکول‌ها و ترکیبات متابولیک در سلول‌های گیاهی است. همچنین جزء اصلی تشکیل دهنده اسیدآمینه، در ساختمان پروتین‌ها است. نیتروژن در ساختار آدنوزین تری فسفات[۴] وجود دارد پس در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شاهد
(*- نویسنده مسئول: Email: i.rohollahi@shahed.ac.ir)
۳- استادیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

DOI: 10.22067/jhorts4.v35i1.86111

4- ATP

انتقال انرژی و متابولیسم سلولی نقش مهمی دارد (۹). بنابراین، یکی از عوامل مهم در کاربرد محلول‌های غذایی، کنترل میزان نیتروژن است که به دو عامل غلظت و نوع منبع نیتروژن بستگی دارد و می تواند عملکرد و کیفیت تولید را تحت تأثیر قرار دهد (۲).

نیتروژن به عنوان ماده غذایی معدنی در حجم وسیعی مورد نیاز گیاهان می‌باشد. یون‌های نیترات و آمونیوم دو فرم اساسی نیتروژن هستند که توسط گیاهان جذب می‌شوند. اگرچه نیترات جذب شده از محیط قبل از جذب شدن به عنوان نیتروژن آلی به آمونیوم احیا می شود، ولی آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژن اثرات متفاوتی در رشد و ترکیب شیمیایی گیاهان خواهند داشت (۷).

در نسبت آمونیوم به نیترات ۶:۱ محیط کشت بافت با استفاده از غلظت آگار ۱۰ گرم در لیتر بهترین میزان شاخه‌زایی و کمترین میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های گل میخک[1] گزارش شده است (۷). در مطالعه تاثیر محتوای نیتروژن کل و نسبت آمونیوم به نیترات بر بیوماس و متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول مریم گلی[2] مشخص شد که نیتروژن کل ۹۰ میلی‌مولار باعث بیشترین وزن تر و نیتروژن ۳۰ و ۶۰ میلی‌مولار باعث بالاترین میزان متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید[3] می‌گردد، علاوه بر این بیشترین میزان محتوای کل فنول و بایومس وزن تر و محتوای رزمارینیک اسید در نسبت ۱۰:۵۰ آمونیوم به نیترات مشاهده شد (۶).

بسیاری از گونه‌های خانواده آراسه[4] با استفاده از نمونه‌های برگی طی فرایند القا کالوس و باززایی بعدی گیاهچه از آن ریز ازدیادی می شوند (۱۲). از طرفی کاربرد تنظیم کننده رشد اکسین به عنوان یکی از عوامل موثر در تشکیل کالوس مطرح می‌باشد (۹). تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D به تنهایی در گیاه *Papaver bracteatum* باعث تولید حداکثر میزان وزن کالوس می‌شود (۱۶). غلظت مصرف در طی تیمار تنظیم کننده رشد اکسین از اهمیت بالایی برخوردار است، عوامل مختلفی مانند مواد غذایی و میزان هورمون‌های افزوده شده به محیط کشت بر سرعت رشد زامیفولیا در محیط درون‌شیشه‌ای موثر می‌باشند. در پژوهشی که برروی گیاه زامیفولیا انجام شده بهترین محیط کشت برای القای کالوس، محیط کشت M.S همراه با تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D با غلظت ۹/۰۵ میکرومولار اعلام شده است (۱۲). طی مطالعه سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زامیفولیا در محیط کشت‌های مختلف شامل ۱- پیت ماس:پرلیت (۱:۱) ۲. پیت‌ماس:پرلیت (۲:۱) ۳- پیت‌ماس:پرلیت (۱:۰) نشان داده شد که پیت ماس:پرلیت (۱:۱) بهترین محیط کشت جهت سازگاری گیاهچه های زامیفولیا می‌باشد (۱۱).

با توجه به اهمیت منابع نیتروژن، کیفیت محیط کشت بافت و تاثیر 2,4-D بر سرعت و کیفیت رشد نمونه های گیاهی با هدف ارزیابی تاثیر غلظت محیط کشت MS تغییر یافته، غلظت‌های مختلف نیتروژن کل، نسبت متفاوت نیترات به آمونیوم و تنظیم کننده‌های رشد بر کیفیت و سرعت تولید گیاهچه‌های کشت بافتی زامیفولیا این پژوهش انجام شد. با توجه به اسقبال عمومی بسیار بالا از این گیاه و با توجه به رشد بسیار کند گیاه زامیفولیا، با تیمارهای اعمال شده در این تحقیق زمان لازم برای تولید گیاهچه‌های کشت بافتی به مقدار قابل توجهی کاهش خواهد یافت.

مواد و روش‌ها

باتوجه به نتایج تحقیقات گذشته توسط پاپافوتیو و مارتینی (۱۱) بهترین ریزنمونه جهت دست‌یابی به کالوس و گیاهچه کامل، برگ دارای دمبرگ و رگبرگ اصلی می‌باشد. تعدادی گلدان از گیاه زامیفولیا تهیه شد. برگ‌های مناسب جدا شدند و به محیط آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا برگ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با آب جاری شستشو شدند. سپس برگ‌ها در زیر هود لامینار به مدت ۲۰ دقیقه درون هیپو کلرید سدیم ۳/۵ درصد قرارداده شدند. در مرحله بعدی، با آب مقطر استریل سه بار آبکشی شده و بعد به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها از الکل خارج و بعد از آب‌شویی مجدد در محیط کشت مناسب بصورت عمودی کشت شدند (۱۱).

به منظور تولید کالوس از محیط کشت پایه MS تغییر یافته و MS ۱/۲ تغییر یافته به عنوان دو تیمار استفاده شد. محیط کشت‌های موردنظر با تنظیم کننده رشد 2, 4-D در دو غلظت ۹/۰۵ و ۱۸/۱ میلی‌مولار که در تحقیق‌های گذشته به عنوان بهترین تنظیم کننده رشد معرفی شده بودند استفاده شد پس از گذشت ۶ هفته اندازه کالوس (سانتی‌متر مربع) توسط کاغذ شطرنجی مورد بررسی قرار گرفت.

در ادامه برای تولید گیاهچه‌های کشت بافتی گیاه زامیفولیا با توجه به نتایج مثبت تحقیقات انجام شده توسط پاپافوتیو و مارتینی (۱۱) هورمون‌های BAP (۲/۲۲ میکرو مولار) و NAA (۲/۶۹ میکرو مولار) به صورت ثابت به همه تیمارها اضافه شد، در این تحقیق تاثیر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم ۱:۱و ۱:۳ و غلظت نیتروژن کل محیط کشت ۲۴ و ۴۸ میکرومولار (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور محیط کشت‌های مختلف با غلظت تنظیم کننده‌ی رشد ثابت و نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم و غلظت نیتروژن کل مطابق (جدول ۱) ساخته شد. پس از گذشت ۹، ۱۳، ۱۶، ۲۰ و ۲۳ هفته اندازه کالوس، اندازه اندام جنین مانند (سانتی‌متر مربع) و تعداد برگ مورد بررسی قرار گرفت.

1- *Dianthus caryophyllus* L. cv. Mondeo Kgr
2- *Salvia nemorosa*
3- Rosmarinic acid
4- Araceae

در مرحله پایانی گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای برای سازگاری به گلخانه منتقل شدند. گیاهچه‌های دو برگی از محیط کشت درون‌شیشه‌ای خارج، باقی مانده‌های آگار روی ریز نمونه‌ها به دقت توسط آب مقطر پاک‌سازی و به بسترهای مناسب منتقل شدند (شکل ۷). بعد از یک هفته سازگاری در اتاقک رشد انتقال گلدان‌ها به گلخانه انجام شد. بسترهای مورد بررسی در این مرحله شامل: ۱- بستر پیت ماس ۱۰۰ درصد، ۲- بستر پیت ماس + پرلیت با نسبت ۱:۱، ۳- بسترماسه رودخانه‌ای ۱۰۰درصد بود. بسترهای آماده شده در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت۳۰ دقیقه استریل شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز تعداد جوانه‌های برگی و وضعیت سازگاری گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- مقادیر عناصر پرمصرف، با نسبت‌های مختلف NH_4: NO_3 در غلظت نیتروژن کل ۲۴ و ۴۸ میکرومولار

Table 1- Macro–nutrient concentration in different NH_4: NO_3 ratio in total nitrogen concentration 24 and 48 µM

مقدار نیتروژن کل µM۲۴ – (µM)مقادیر عناصر پرمصرف Macro nutrient (µM) - Total nitrogen concentration 24 µM						
NH_4:NO_3	NH_4NO_3	$Ca(NO_3)_2$	$CaCl_2$	K_2SO_4	KH_2PO_4	$MgSO_4$
25:75	6	6	0	5	10	2
50:50	12	0	6	5	10	2
مقدار نیتروژن کل ۴۸ µM – (µM)مقادیر عناصر پرمصرف Macro nutrient (µM) - Total nitrogen concentration 48 µM						
25:75	12	12	0	10	20	4
50:50	24	0	12	10	20	4

طرح‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز آماری نتایج حاصل از بهینه‌سازی کشت کالوس به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور محیط کشت MS تغییر یافته (در دو سطح) و تنظیم کننده رشد 2, 4-D (در دو سطح) در ۲۰ تکرار، آزمایش بهینه‌سازی تولید گیاهچه در شرایط درون شیشه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور نیتروژن کل (در دو سطح) و نسبت نیترات به آمونیوم (در دو سطح) در ۴ تکرار و آزمون سازگاری گیاهچه‌ها در محیط برون شیشه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار اجرا و با نرم‌افزار آماری SAS نسخه۹/۳ تجزیه آماری شدند. جهت بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تولید کالوس

نتایج آزمایش نشان داد که کاهش غلظت محیط کشت به ۱/۲M.S. تغییر یافته باعث افزایش معنی‌دار اندازه کالوس‌های تولید شده در سطح احتمال ۱ درصد می‌شود (شکل ۱). اثر متقابل تنظیم کننده رشد 2,4-D و محیط کشت M.S تغییر یافته نشان داد که محیط کشت ۱/۲M.S. تغییر یافته در غلظت ۹/۰۵ میکرو مولار 2,4-D به نحو معنی‌داری اندازه کالوس را تا ۵ برابر نسبت به تیمار M.S. تغییر یافته افزایش داده است (شکل ۱). بر اساس مطالعه‌های انجام شده تشکیل کالوس به نوع گونه گیاهی، مرحله نمو، سن گیاه مادری و نوع ریزنمونه بستگی دارد (۱). علاوه براین، تاثیر مقدار و نوع تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده برای تولید کالوس در گیاهان مختلف، بستگی به وجود هورمون‌های درون‌زای گیاهی خواهد داشت (۱۳).

نتایج حاصل از تحقیقات پیشین نشان داده است که کالوس‌زایی نیازمند ترکیب اکسین و سیتوکینین با غلظت‌های مناسب می‌باشد (۱۳ و ۱۵). در این پژوهش غلظت مناسب تنظیم کننده رشد 2,4-D سبب القا و ایجاد کالوس در مقایسه با تیمار دیگر شد. به نظر می‌رسد این تنظیم کننده رشد با اثر گذاری و راه‌اندازی فرایندهای مختلف سلولی از قبیل تقسیم سلولی در القا کالوس‌زایی نقش موثری داشته است. تاثیر مثبت تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D برای ایجاد کالوس در گیاه زامیفولیا در سایر مطالعه‌های انجام شده نیز تایید شده است (۱۱).

تولید اندام‌های جنین مانند و تولید گیاهچه کامل از کالوس

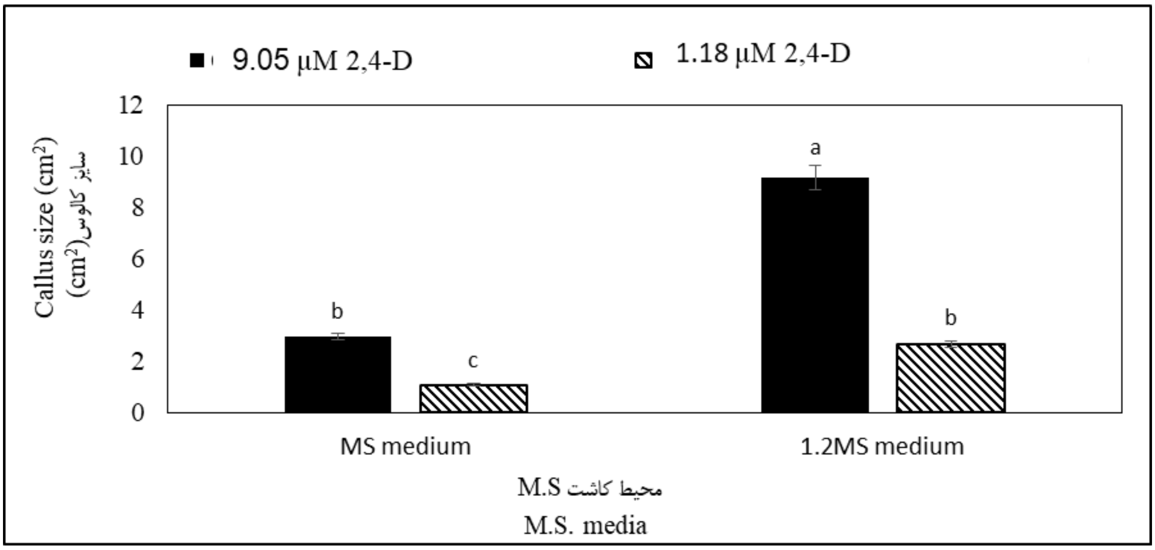
۱۶ هفته بعد از واکشت بیشترین اندازه اندام‌های جنین مانند (۴/۵ سانتی‌متر مربع) مربوط به برهم‌کنش نیتروژن کل ۲۴ میکرومولار و نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۳ و کمترین اندازه اندام‌های جنین مانند (۳/۵ سانتی‌متر مربع) مربوط به برهم‌کنش نیتروژن کل ۲۴ میکرومولار و نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۱ می‌باشد (جدول ۲). ۲۳ هفته پس از واکشت، بیشترین مقدار اندازه اندام‌های جنین مانند (۹ سانتی‌متر مربع) مربوط به برهم‌کنش نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۱ و غلظت نیتروژن کل ۴۸ میکرو مولار و کمترین اندازه اندام‌های جنین مانند (۴/۵ سانتی‌متر مربع) متعلق به نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۱ و غلظت نیتروژن کل ۲۴ میکرو مولار می‌باشد (جدول ۲).

در تیمار ۲۴ میکرومولار نیتروژن و نسبت ۳ :۱ نیترات به آمونیوم، افزایش بیشتری در اندازه اندام‌های جنین مانند نسبت سایر تیمارها

مشاهده می‌شود (جدول ۲). در تیمار ۴۸ میکرومولار نیتروژن و نسبت ۱ :۱ نیترات به آمونیوم، افزایش بیشتری در انـدازه انـدام‌هـای جنـین مانند نسبت سایر تیمارها مشاهده می‌شود (جدول ۲).

اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن کـل، نسـبت‌هـای متفـاوت نیترات به آمونیوم و اثر برهم‌کنش آن‌ها بر تعداد برگ

نتایج نشان داد که اثر تیمار غلظت نیتروژن کل و نسـبت غلظـت نیترات به آمونیوم بر تعداد برگ تشکیل شده، در هفته ۲۳ بعد واکشت به ترتیب در سطح احتمـال ۵ درصـد و ۱ درصـد معنـی‌دار مـی‌باشـد (جدول ۲). سایر تیمارها اثر معنی‌داری بر تعداد بـرگ نداشـتند. نتـایج مربوط به باززایی گیاهچه و تعداد برگ نشان داد که در ۲۳ هفته بعـد از واکشت اندام‌های جنین مانند تحت تیمار ۲۴ میکرومـولار نیتـروژن (جدول ۲) و نسبت ۳ :۱ نیترات به آمونیـوم (جـدول ۲) سـریع‌تـر بـه سمت تولید گیاهچه و افزایش تعداد برگ رفتند. تغییر فرایند رشـد بـه موازات تغییر فرم‌هـای مختلـف نیتـروژن و تغییـر نسـبی نیتـرات بـه آمونیوم مربوط به توانـایی گونـه‌هـای گیـاهی در جـذب نیتـروژن یـا آمونیوم می‌باشد، سطح اولیه اسـیدیته محـیط کشـت در ابتـدای دوره موجب جذب آمونیوم می‌شود ولی اسیدیته محیط کشت در بلند مـدت افزایش یافته و شرایط برای جذب نیترات فراهم شده و جذب این فرم نیتروژن افزایش می‌یابد (۴).



شکل ۱- تأثیر بر هم‌کنش غلظت 2,4-D × غلظت نمک‌های محیط کشت MS تغییر یافته بر اندازه کالوس گیاه زامیفولیا

Figure 1- The interactioneffect of 2.4-D ×modified MS salt concentration on callus size of Zamifolia (DMRT, *p≤0.01*)

جدول ۲- اثر برهم‌کنش غلظت نیتروژن کل×نسبت نیترات به آمونیوم بر اندازه اندام‌های جنین مانند گیاه زامیفولیا در هفته‌های ۱٦ و ۲۳ و تعداد برگ در هفته ۲۳

Table 2- Interaction effect of total nitrogen concentration× nitrate/ammonium ratio on the size of embryo-like organs at 16 and 23 weeks and leaf number at 23 weeks in

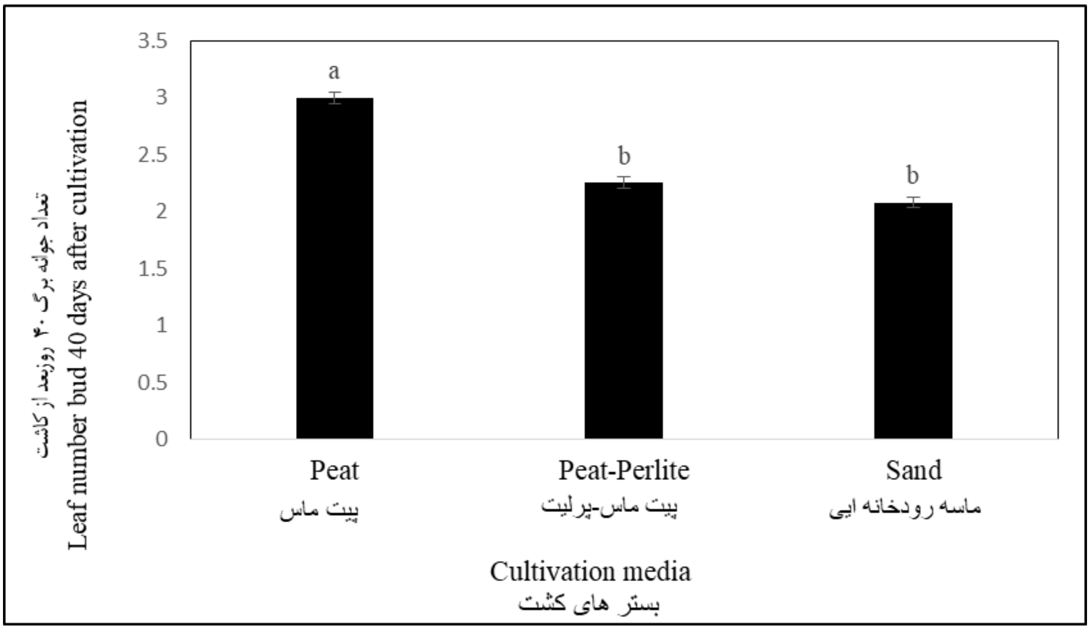
غلظت نیتروژن کل Total nitrogen concentration	نسبت آمونیوم به نیترات Ammonium nitrat ratio	اندازه اندام جنین مانند Embryo-like size (cm^2)	اندازه اندام جنین مانند Embryo-like size(cm^2)	تعداد برگ Number of leaves
Weeks after subculture*		**16**	**23**	**23**
24	1:1	3.5 b	4.5 c	-
24	3:1	4.5 a	8.25 a	-
48	1:1	4 ab	9 a	-
48	3:1	3.75 b	6.25 b	-
24	-	-	-	2.62 a
48	-	-	-	0.75 b
-	1:1	-	-	0.37 b
-	3:1	-	-	3 a

**عددهای دارای حرف‌های مشترک در هر ستون براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

*هفته بعد از کشت در محیط کشت MS حاوی ۲/٦۹ میکرومولار NAA و ۲/۲۲ میکرومولار BAP.

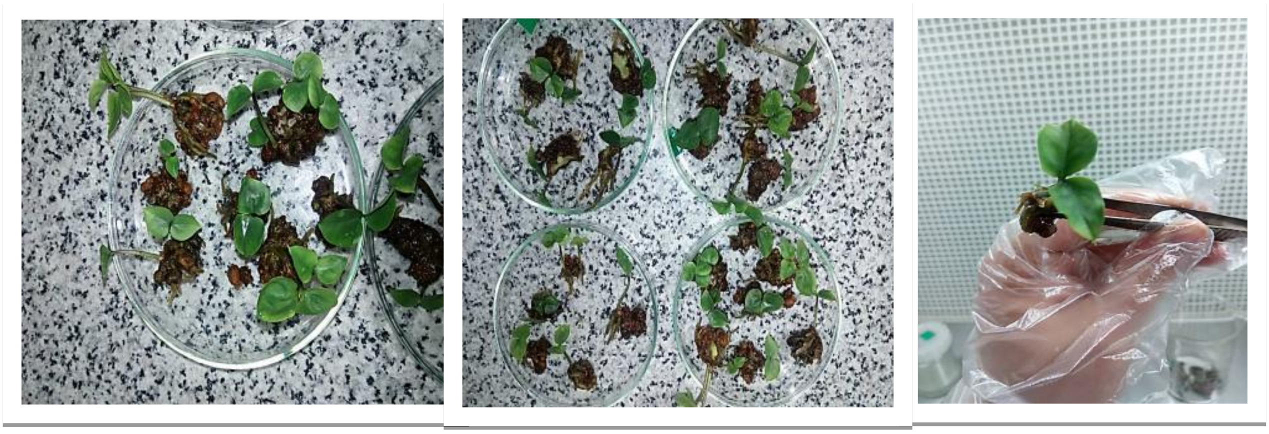
** In each column, means with similar letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% of probability level.

*Weeks after culturing in MS medium + NAA at 2.69 µM+ BAP al 2.22 µM



شکل ۲- اثر بسترهای مختلف کشت بر تعداد جوانه برگ گیاه زامیفولیا

Figure 2- The effect of cultivation beds on leaf bud number of Zamifolia (DMRT, *p≤0.01*)



شکل ۷- نمونه گیاهچه‌های زامیفولیا آماده برای انتقال به مرحله سازگاری

Figure 7- Samples of Zamifolia seedlings ready to be transferred for acclimatization

همانطورکه نتایج نشان داد تولید گیاهچه، برگ در تیمار ۲۴ میکرومولار نیتروژن کل بیشتر و در تیمار غلظت نیتروژن کل ۴۸ میکرومولار کمتر بوده است (جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده در بخش پیشین، در هفته‌های انتهایی تحت تیمار ۲۴ میکرومولار اندازه و رشد اندام‌های جنین مانند افزایش کمتری را نسبت به تیمار ۴۸ میکرومولار نیتروژن کل نشان داد (جدول ۲). بنابراین می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که احتمالا افزایش غلظت نیتروژن کل سبب ادامه افزایش رشد و اندازه اندام‌های جنین مانند و کاهش باززایی و تشکیل گیاهچه شده است. در حالی‌که غلظت ۲۴ میکرومولار نیتروژن کل در ابتدا سبب افزایش رشد و اندازه اندام‌های جنین مانند و در مراحل بعدی سبب باززایی بیشتر و رشد سریع‌تر گیاهچه شده است. همچنین نسبت ۱:۳ نیترات به آمونیوم سبب باززایی بیشتر و رشد بهتر گیاهچه در مقایسه با سایر تیمارها شد. احتمالا اندام‌های جنین مانند زامیفولیا تمایل و توانایی بیشتری به جذب فرم نیتراته، برای باززایی سریعتر و رشد بیشتر گیاهچه دارد. به‌طور کلی مقدار و نوع نیتروژن جذبی به نوع، مرحله رشدی و سن گیاه بستگی دارد. مطالعات پیشین نشان داده است در غلظت‌های زیاد نیتروژن، گیاه بیش از حد رشد می‌کند، ولی به تدریج از رشد بازمانده و ساقه‌های قوی ضخیم به همراه میانگره‌های کوتاه به‌وجود می‌آورد و در نتیجه باعث کاهش گل‌دهی و ریشه‌زایی، تأخیر در رشد جوانه‌های

جانبی و تشکیل میوه می‌شود. مصرف بیش از حد نیتروژن باعث افزایش غلظت نمک‌های محلول در بستر می‌شود و در نهایت به نوک ریشه‌ها آسیب وارد می‌کند (۳). همچنین محققین ذکر کرده‌اند سطح برگ هم یکی از خصوصیات بسیار مهم در رشد گیاه است که تحت تأثیر تغذیهٔ گیاه قرار می‌گیرد، استفاده زیاد از نیتروژن آمونیومی به دلیل کاهش سطح برگ و تبادلات گازی به کاهش فتوسنتز خالص منجر می‌شود (۱۲). افزایش غلظت نیتروژن آمونیومی سبب اختلال در شاخص‌های کیفی می‌شود (۷ و ۵). کاربرد نیتروژن آمونیومی، اسیدی شدن محیط ریشه، جذب بیش از حد عناصر کاتیونی نسبت به عناصر آنیونی یا سمیت ناشی از NH_4^+ متابولیزه نشده، در خصوصیات کیفی اختلال ایجاد می‌کند (۹). بعد از انتقال گیاهچه‌ها از شرایط درون شیشه‌ای به شرایط سازگاری و بسترهای پیت ماس ۱۰ و پیت ماس + پرلیت با نسبت ۱:۱و ماسه رودخانه‌ای مشخص شد که بیشترین تعداد جوانه برگی (شکل ۲) و به دنبال آن تعداد و طول برگ در بستر کاشت پیت ماس مشاهده شد. این در حالی است که پاپافوتیو و مارتینی (۱۱) بستر کاشت پرلیت: پیت ماس (۱:۱) را به عنوان محیط کاشت مناسب معرفی کرده بودند، البته در تحقیق مذکور محیط کاشت پیت ماس مورد ارزیابی قرار داده نشده بود.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از این پژوهش و در تایید پژوهش پاپافوتیو و مارتینی (۱۱) کشت بافت زامیفولیا می‌تواند روش کارآمدی برای بهبود شرایط رشد زامیفولیا باشد. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده از بخش اول این پژوهش نشان داد که محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۹/۰۵ میکرومولار و محیط کشت MS ۱/۲ تغییر یافته بهترین محیط کشت جهت القای کالوس و رشد کالوس زامیفولیا در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. در مرحله دوم، محیط کشت حاوی ۲/۶۹ میکرومولار NAA و ۲/۲۲ میکرومولار BAP M.S.+ تغییر یافته همراه با ۲۴ میکرومولار ازت با نسبت نیترات به آمونیوم ۱:۳ بهترین محیط کشت در هفته‌های ابتدایی تولید گیاهچه جهت افزایش رشد اندام‌های جنین مانند ، افزایش تعداد برگ در هفته‌های انتهایی نسبت به سایر تیمارهای تحت مطالعه بود. بر اساس این پروتکل می‌توان از تعداد بسیار کم برگ، در بازه‌ی زمانی حدود ۱۶ هفته به تعداد بسیار زیادی گیاه کامل زامیفولیا دست یافت و آنها را در محیط برون شیشه ای در بسترهای کاشت پیت ماس سازگار نمود، که در مقایسه با سایر روش‌های تکثیر این گیاه، و پژوهش‌های مشابه که در بازه‌ی زمانی حدود ۳۰ هفته انجام شده از نظر اقتصادی بسیار توجیه‌پذیر است.

منابع

1- Abrishamchi P. 2011. Callus Induction and Plant Regeneration from Meristem Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Quarterly Journal of Science Kharazmi University 10(4): 1011-1032. (In Persian with English abstract)

2- Agbaria H., Heuer B., and Zieslin N. 1996. Shoot-root interaction effects on nitrate reductase and glutamine synthetase activities in rose (Rosa× hybrida cvs. Ilseta and Mercedes) graftlings. Journal of Plant Physiology 149(5): 559-563.

3- Erdal I., Ertek A., Senyigit U., and Yılmaz H. 2006. Effects of different irrigation programs and nitrogen levels on nitrogen concentration, uptake and utilisation in processing tomatoes (*Lycopersicum esculentum*). Australian Journal of Experimental Agriculture 46(12): 1653-1660.

4- Hajnajari H., Hasanloo T., Asghari A., and Izadpanah M. 2009. Effects of different sources of nitrogen on in vitro growth characteristics of a selected genotype of wild cherry (*Prunus avium* L.). Seed and Plant 24(4): 749-762. (In Persian with English abstract)

5- Hartman P.L., Mills H., and Jones Jr J.B. 1986. The influence of nitrate: ammonium ratios on growth, fruit development, and element concentration in 'Floradel' tomato plants. Journal of the American Society for Horticultural Science 111(4): 487-490.

6- Heydari H.R., Chamani E., and Esmaeilpour B. 2020. Effect of total nitrogen content and NH_4/NO_3 ratio on biomass accumulation and secondry metabolic production in cell culture of *S. nemorosa*. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 9(7): 17-27.

7- Kharrazi M., Nemati S.H., Tehranifar A., Bagheri A.R., and Sharifi A. 2012. Evaluation ratio of ammonium to nitrate and agar concentrations on micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. cv. Monodeo. Journal of Horticulture Science 26(4): 369-364. (In Persian)

8- Lopez R.G., Blanchard M.G., and Runkle E.S. 2007. Propagation and production of *Zamioculcas zamiifolia*. In VI International Symposium on New Floricultural.4 March 2009. ISHS Acta Horticulturae (813): 559-564 Crops 813. Funchal, Madeira, Portugal.

9- Magalhaes J., and Wilcox G. 1984. Growth, free amino acids, and mineral composition of tomato plants in relation to nitrogen form and growing media [Peat, vermiculite, sand, solution culture]. Journal American Society for

Horticultural Science 109(3): 406-411.
10- Novoa R., and Loomis R. 1981. Nitrogen and plant production. Plant and Soil 58(1-3): 177-204.
11- Papafotiou M., and Martini A.N. 2009. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). Scientia Horticulture 120(1): 115-120.
12- Rahman M.J., Mondol A., Rahman M.N., Begum R.A., and Alam M.K. 2007. Effect of irrigation and nitrogen on tomato yield in the grey terrace soil of Bangladesh. Journal of Soil Nature 1(3): 01-04.
13- Rao S., Patil P., and Kaviraj C. 2005. Callus induction and organogenesis from various explants in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Indian Journal of Biotechnology 4(4). 197- 212.
14- Rishi A. 2011. *In vitro* callus induction and regeneration of healthy plants of Gloriosa superba Linn. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 1(1): 64-65.
15- Rostampour S., Sohi H., and Dehestani A. 2010. In vitro regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). Biologia 65(4): 647-652. (In Persian with English abstract)
16- Zare A.R., Solouki M., Omidi M., Irvani N., Nezad N.M., and Rezazadeh S. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Ferula assafoetida* L. (Asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences 8 (1): 11-18.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.1, Spring 2021, P. 55-62
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۶۲-۵۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Effect of Different Concentrations of Nitrogen and 2,4-D on Callus and Plantlet Production of *Zamioculcas zamiifolia* Engl under *In vitro* Condition

A. Ghoochani Khorasani[1]- I. Rohollahi[2*]- P. Golkar[3]
Received: 25-04-2020
Accepted: 27-09-2020

Introduction: Zamifolia, *Zamioculcas zamiifolia*, belongs to the family Araceae, *In vitro* propagation is suggested for increase the propagation rate and disease-free production of explants because of vegetative propagation of Zamifolia. Micropropagation is one of the commercial aspects of indoor cultivation and has many advantages over conventional methods of vegetative propagation. Nitrogen is an important component in the structure of molecules and metabolic compounds in plant cells. It is also a major constituent of amino acids in the structure of proteins. Therefore, nitrogen source and its type are important factors in the application of nutrient solutions, controlling the amount of nitrogen, which is divided into two factors: concentration and type of nitrogen source. In this study, the effects of 2.4, D as plant growth regulator, different concentrations of total nitrogen and nitrate to ammonium ratios on growth of Zamifolia were investigated in separate experiments.

Materials and Methods: According to the results of previous studies, the best explants for achieving full callus and seedling are petiole and main vein leaf. The leaves were rinsed with running water for 20 minutes. The leaves were then immersed in 3.5% sodium hypochlorite under laminar hood for 20 minutes. Next, they were rinsed with sterile distilled water three times and then immersed in 70% alcohol for 60 seconds. Finally, the samples were extracted from alcohol and cultured in a suitable culture medium vertically. In the first experiment, callus production from whole leaf of Zamifolia was studied in MS and 1/2 MS medium with two concentrations of 2,4-D (9.05 and 18.1 M). In the second experiment, the effect of two concentrations of total nitrogen at 60 and 30 μM and two nitrate to ammonium ratio (1: 3 and 1: 1) in presence of naphthalene acetic acid (2.69 μM) and benzyl amino purine (2.22 μM) were studied on whole plantlet production in the shortest growth period. After 16 weeks of continuous culture in the subculture medium, entire explants with tubers, roots and 1-2 expanded leaves were transferred to ex vitro condition, in peat, peat: perlite (1:1) and sand and then on a shaded greenhouse bench. Statistical analysis of the results was factorial based on completely randomized design with 20 replications, and plantlet production acclimatization test, factorial experiment based on completely randomized design with four replications, were performed and analyzed with SAS software version 9.3

Results and Discussion: The results of the first experiment showed that the largest calli were produced in MS 1.2 and 2,4-D 9.5 μM. After 16 weeks, largest embryo-like size (4.5 cm^2) can be seen in the same treatment under nitrogen concentration (30 μM) and nitrate to ammonium ratio (1: 3). On the other hand, the smallest embryo-like structure size (3.5 cm^2) is related to interaction of nitrogen concentration (30 μM) and nitrate to ammonium ratio (1: 1). Overall, the results of the first part of this study showed the best callus induction and growth of Zamifolia callus under culture conditions under modified M.S. 1.2 and 2, 4-D 9.5 μM. Secondly, culture medium NAA 2.69 μM + BAP 2.22 μM and modified M.S. media and nitrogen concentration of 30 μM and nitrate to ammonium ratio (1: 3). The best medium for embryo like structure growth in the early regeneration and seedling production weeks, increased leaf number in the last weeks compared to other treatments. According to this protocol, small number of leaves can be propagated to over a period of about 16 weeks to a large number of *Zamifolia* plants, which is comparable to other methods of reproduction of this plant, and similar studies that it has been economically justified to do this for about 30 weeks.

Conclusion: Based on our results, we can conclude *Zamifolia* tissue culture can be an effective way to improve it growth conditions which can get acclimatized in ex vitro conditions on peat medium.

Keywords: Callus, Nitrate to ammonium ratio, Zamifolia

---

1 and 2- Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Shahed University, respectively.
(*- Corresponding Author Email: i.rohollahi@shahed.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111 Iran
DOI: 10.22067/jhorts4.v35i1.86111